基础研究

血小板活化因子受体在伴放线放线杆菌致病过程中的作用

王 勤[1,2],轩东英[1],钟德钰[1],屈娅荣[2,3],余晶仪[2],曹 虹[2],章锦才[1]
[1]南方医科大学附属口腔医院//广东省口腔医院,广东 广州 510280;[2]南方医科大学公共卫生与热带医学学院微生物学系,广东 广州 510515;[3]陕西省安康市疾病预防控制中心,陕西 安康 725000

摘要:目的 研究血小板活化因子受体(PAFR)在磷脂酰胆碱(PC)阳性伴放线放线杆菌(Aa)黏附侵袭人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)过程中的作用。**方法** 利用PAFR拮抗剂(CV3988)和抗PAFR抗体作用于HUVEC 30 min后,观察PC阳性Aa对HUVEC黏附和侵袭的影响;并采用MTT法分析PC阳性和阴性Aa诱导细胞损伤的情况。**结果** 采用100、200、500 nmol/L的PAFR拮抗剂预处理HUVEC,显著减少了PC阳性Aa对HUVEC的黏附和侵袭($P<0.001$),黏附率分别为对照组的(36.29±3.52)%,(19.04±3.35)%和(7.69±3.19)%;侵袭率分别为对照组的(12.12±1.58)%,(7.08±0.29)%和(2.60±2.26)%。用抗PAFR抗体预处理HUVEC后Aa对HUVEC的黏附率和侵袭率分别为(50.05±5.28)%和(39.09±6.50)%,显著降低了Aa对宿主细胞的黏附和侵入($P<0.001$)。采用200 nmol/L和500 nmol/L的PAFR拮抗剂和25 μg/mL抗PAFR抗体预处理HUVEC后,PC阳性的Aa与细胞作用以后,细胞的存活率显著升高($P<0.001$),从(25.39±9.33)%分别升高到(91.12±3.14)%,(94.12±2.15)%和(65.5±1.87)%。而PC阴性的Aa菌株中,预处理组与未预处理的组相比,细胞活力并没有显著增加($P>0.05$)。**结论** 我们发现PAFR在PC阳性的Aa对宿主细胞的粘附、侵袭及诱导胞死亡的过程中发挥了重要作用。
关键词:伴放线放线杆菌;血小板活化因子受体;人脐静脉血管内皮细胞;黏附率;侵袭率

Role of platelet-activating factor receptor in adhesion and invasion of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in human umbilical vein endothelial cells

WANG Qin[1], XUAN Dongying[1], ZHONG Deyu[1], QU Yarong[2], YU Jingyi[2], CAO Hong[2], ZHANAG Jincai[1]
[1]Department of Periodontology, Stomatological Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Guangzhou 510280, China; [2]Department of Microbiology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; [3]Center for Disease Control and Prevention of Ankang, Ankang 725000, China

Abstract: Objective To explore the role of platelet-activating factor receptor (PAFR) in adhesion and invasion of phosphorylcholine (PC)-positive *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** Cultured HUVECs were pretreated with the PAFR antagonist CV3988 or anti-human PAFR monoclonal antibody for 30 min before infection with PC-positive or -negative *A. actinomycetemcomitans* strains. The bacterial adhesion and invasion and cytotoxicity in the cells were examined using MTT assay. **Results** Pretreatment with PAFR antagonists at 100, 200 and 500 nmol/L significantly reduced the adhesion rate []36.29±3.52)%, (19.04±3.35)% and (7.69±3.19%), respectively] and invasion rate [(12.12±1.58)%, (7.08±0.29)% and (2.60±2.26)%, respectively] of PC-positive *A.actinomycetemcomitans* in HUVECs. Similarly, pretreatment with anti-PAFR antibody also significantly reduced *A.actinomycetemcomitans* adhesion and invasion in HUVECs [(50.05±5.28)% and (39.09±6.50)%, respectively]. Pretreatment with PAFR antagonist (200 and 500 nmol/L) and anti-PAFR antibody (25 μg/mL) significantly increased the viability of HUVECs incubated with PC-positive *A.actinomycetemcomitans* from (25.39±9.33)% to (91.12±3.14)%, (94.12±2.15)% and (65.5±1.87)%, respectively, but such pretreatments did not increase the viability of cells incubated with PC-negative *A.actinomycetemcomitans*. **Conclusions** PAFR plays an important role in the adhesion, invasion, and cytotoxicity of PC-positive *A.actinomycetemcomitans* in cultured HUVECs.
Key words: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; platelet-activating factor receptor; human umbilical vein endothelial cells; adhesion; invasion

近年来,磷脂酰胆碱(PC)作为病原菌的一种重要致病因子受到越来越多的重视。有文献报道PC不仅有助于流感嗜血杆菌在呼吸道中持续存在,促进其粘附并侵入支气管上皮细胞[1-3],PC在体内和体外还与其生物膜的成熟有关,可以使其生物膜密度增厚[4]。PC阳性的流感嗜血杆菌导致渗出性中耳炎的持续性存在,愈合时间延长[5]。

在口腔中的研究发现,PC在伴放线放线杆菌(Aa)的致病过程中亦起到了重要作用[6-8]。龈沟液中PC抗体水平明显高于血清中的水平。牙周附着丧失患者的PC抗体水平明显高于牙周健康者。血清中的抗PC抗体可能对携带PC的Aa菌株起到一定的调理素作用。

收稿日期:2015-03-15
基金项目:国家自然科学基金(81371151);广东省科技计划项目(2015110)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81371151).
作者简介:王 勤,博士,主治医师, E-mail: wangqin115@126.com
通信作者:章锦才,教授,主任医师,博士生导师,E-mail: jincaizhang@live.cn

Schenkein 等[9]还发现携带 PC 的 Aa 菌株与不携带 PC 的 Aa 菌株致病力有明显差异。他们通过透射电镜观察到带有 PC 的 Aa 菌株可以侵入血管内皮细胞，而不带有 PC 的菌株不能侵入血管内皮细胞，可见PC可能是Aa的重要致病因子。

目前PC在大部分病原菌的致病过程中的机制尚不十分清楚，有文献报道，PC可能是通过细菌细胞壁的胆碱成分通过与内皮细胞表面的血小板活化因子受体（PAFR）结合来介导的[10-11]。血小板活化因子（PAF）中含有磷脂酰胆碱成分，当细菌与宿主细胞作用时，细菌中的磷脂酰胆碱通过模拟PAF，与PAFR结合，从而介导细菌对宿主细胞的黏附和侵袭。然而关于PC如何在Aa致病过程中起作用，PAFR是否参与了PC阳性Aa黏附、侵袭宿主细胞的过程的鲜有文献报道，在本实验中我们拟选用人脐静脉血管内皮细胞（HUVEC），建立体外模型，研究 PAFR 在 PC 阳性 Aa 菌株对 HUVEC 的黏附和侵袭过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞株和细菌株

PC 阳性 Aa 菌株(HK1651：美国 ATCC)；PC 阴性 Aa 菌株（ATCC29523：广东省微生物菌种保藏中心）。人脐静脉血管内皮细胞（Human Umbilical Vein Endothelia Cell, HUVEC）：购自中科院上海细胞所细胞库。

1.2 主要试剂

DMEM 培养基、胎牛血清、0.25% EDTA/胰酶均购自 Hyclone；二甲基亚砜（DMSO）购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司；噻唑蓝（MTT）、血小板活化因子受体拮抗剂（CV-3988）购自 Sigma；血小板活化因子受体抗（anti-PAFR）购自药明康德新药开发有限公司。

1.3 细菌的黏附侵袭实验

1.3.1 细胞的准备　将冻存的HUVEC复苏后至少传代2次，将细胞以 1×10^5/孔的浓度接种于 24 孔细胞培养板中，5% CO_2，37 ℃孵育 24 h，待长满细胞单层。实验前用 DMEM 培养基清洗 3 次，分别加入含 CV-3988（终浓度分别为 50、100、200、500 nmol/L）、PAFR 单克隆抗体（终浓度为 2.5 μg/mL）及 TEPC-15（终浓度为 2.5 μg/mL）的完全培养基，作用 30 min。

1.3.2 细菌的准备　将 PC 阳性和阴性菌株复苏后分别倍比稀释接种到 AAGM 平板上，5% CO_2，37 ℃厌氧培养 3~5 d。先在平板上挑取细菌单克隆，以 100：1 接种到脑心浸液培养基中，摇床 37 ℃，250 r/min，摇 12 h。第 2 天再把摇好的菌液取 1~2 mL 的脑心浸液培养基中，同样条件继续摇 12 h。实验前将菌液浓度调整到 1×10^9 cfu/Ml，备用。

1.4 细菌的体外黏附实验

将细菌按照 100：1（MOI=100）的比例加入到每孔细胞中去，37 ℃，5 % CO_2孵育 4 h，去掉培养基，1×PBS 清洗 3 次，加入 150 μL 0.5% Triton-X100，37 ℃孵育 15 min，然后加入 350 μL 去离子水，37 ℃孵育 10 min，轻柔吹打混匀，取 100 μL 样品倍比稀释涂布 AAGM 平板计算菌落数，作为黏附到细胞的细菌数。

1.5 细菌的体外侵袭实验

将细菌按照 100：1 的比例加到每孔细胞，37 ℃，5% CO_2孵育 4 h，用 1×PBS 清洗 3 次，每孔加入 1 mL 完全培养基，再加入终浓度为 200 μg/mL 的庆大霉素 37 ℃孵育 2 h，杀死细胞外细菌，1×PBS 清洗 3 次，加入 150 μL 0.5% Triton-X100，37 ℃孵育 15 min，然后加入 350 μL 去离子水，37 ℃孵育 10 min，轻柔吹打混匀，取 100 μL 样品倍比稀释涂 AAGM 平板计算菌落数，作为侵袭到细胞内的细菌数。

黏附实验和侵袭实验 3 组菌各设 3 个复孔，重复实验 3 次。设置对照组：不加处理剂组。

黏附率= 处理组黏附到细胞的细菌数/未处理组黏附到细胞的细菌总数×100%

侵袭率= 处理组侵入细胞内的细菌数/未处理组侵入细胞内的细菌总数×100%

1.6 MTT 法检测细菌对细胞的活力影响

1.6.1 细胞的处理　实验前 1 d，将培养瓶里的细胞用 0.25%胰酶消化后计数，调整细胞悬液浓度，以 1×10^5 个细胞/孔的浓度接种于 96 孔板，5% CO_2，37 ℃孵育。待细胞贴壁后，分别加入 CV-3988（终浓度分别为 10、20、50、100、200 nmol/L）及 PAFR 单克隆抗体（终浓度为 2.5 μg/mL），作用 30 min。

1.6.2 细菌的处理　细菌的处理方法及步骤如上所述，调整细菌浓度为 1×10^8 cfu/mL，取稀释好的菌液 1 mL，8000 r/min 离心 5 min，弃掉上清，加入 1 mL PBS 重悬，离心 3 次，取 1 mL DMEM 培养基重悬，取 100 μL（MOI=100）加入各孔中。5% CO_2，37 ℃继续孵育 12 h。每孔加入 MTT（5 g/L）20 μL，继续培养 4 h，终止培养，小心吸去孔内培养液，每孔加入 150 μL DMSO，置摇床上低速振荡 10 min，使结晶物充分溶解。置于酶联免疫检测仪，选择 490 nmol/L 处波长，空白孔调零，测定各孔吸光度值（A），各组 A 值取平均值后，以下公式计算存活细胞百分数，存活细胞%=A 实验组/A 对照组×100%。

每组同时设置调零孔（DMEM 培养基）及对照组（未加细菌菌液组），每组设定 3 个复孔，重复实验 3 次。

1.7 统计学处理

数据均表示为均数±标准差，与常数组之间的比较采用单样本 t 检验，用 Bonferroni 法校正检验水准；多组

间比较采用单因素方差分析,不同处理组之间的两两比较,方差齐时采用LSD法,方差不齐时采用Dunnett's T_3法。相关性分析采用Spearman法。P<0.05 认为差异有统计学意义。数据分析采用SPSS 13.0软件。

2 结果

2.1 PAFR对细菌黏附侵袭的影响

为了研究PAFR是否参与了Aa对HUVEC的黏附和侵袭过程,我们将HUVEC用PAFR拮抗剂(CV3988)和抗PAFR抗体预处理30 min后,研究PC阳性Aa的黏附率和侵袭率。经过对数据的统计分析我们发现,当PAFR拮抗剂的浓度达到100 nmol/L时即可以显著的减少Aa对HUVEC的黏附(36.29±3.52)%和侵袭(12.12±1.58)% (P<0.05)。同时根据相关性分析,黏附率和侵袭率与CV3988的浓度均呈显著负相关(黏附率 r=-0.972, P=0.000; 侵袭率 r=-0.972, P=0.000),随着PAFR拮抗剂浓度的升高,Aa对细胞的黏附率和侵袭率逐渐下降,200 nmol/L时的黏附率和侵袭率分别降低为对照组的(19.04±3.35)%和(7.08±0.29)%。当PAFR拮抗剂的浓度为500 nmol/L时,Aa几乎不能够对HUVEC进行黏附(7.69±3.19)%和侵袭(2.60±2.26)%,如图1和图2所示。

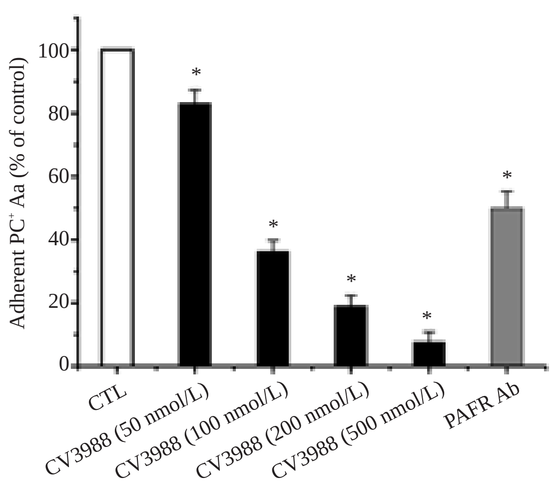


图1 PC阳性Aa的相对黏附率

Fig.1 Relative adhesion of PC-positive Aa in cultured HUVECs (%, *Mean*±*SD*). The adhesion of Aa differed significantly between pretreated and unpretreated cells (*P<0.05).

同样,用抗PAFR抗体预处理HUVEC后,与对照组相比,Aa对HUVEC的黏附率和侵袭率均有显著的降低,分别为(50.05±5.28)%和(39.09±6.50)%,明显的阻止了Aa对宿主细胞的黏附和侵入(图2)。

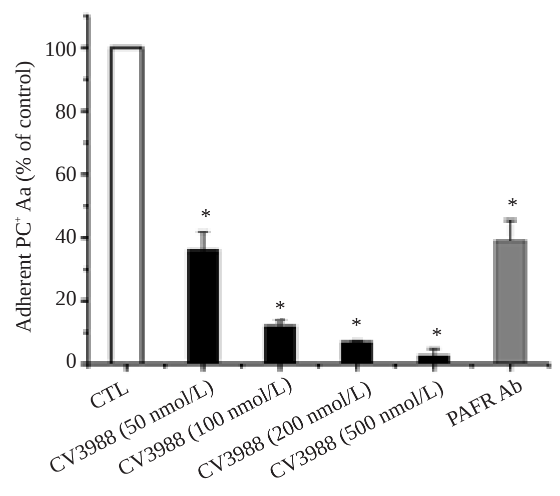


图2 PC阳性Aa的相对侵袭率

Fig.2 Relative invasion of PC-positive *Aa* in cultured HUVECs (%, *Mean*±*SD*). The invasion rates differed significantly between pretreated and unpretreated cells (*P<0.05).

2.2 PAFR参与细菌诱导细胞损伤的研究

为了研究PAFR是否参与了PC阳性的Aa诱导的细胞损伤的过程,我们将PAFR拮抗剂(CV3988)和抗PAFR抗体作用于细胞后,采用MTT法分别分析了PC阳性和阴性的Aa诱导的细胞损伤情况。

我们首先对HUVEC在不同的处理剂中的存活率进行了分析,将结果进行统计学分析,发现HUVEC在各种浓度的处理剂中的存活率无明显差异(P>0.05),如表1所示。从而排除了因处理剂对细胞的影响而引起的各组间细胞存活率的差异。

在PC阳性的Aa组,我们发现,各组间细胞存活率有显著差异(F=87.749, P<0.001),用200 nmol/L和500 nmol/L的PAFR拮抗剂和25 μg/mL抗PAFR抗体预处理HUVEC后,细胞的存活率显著升高,从(25.39±9.33)%分别升高到(91.12±3.14)%,(94.12±2.15)%和(65.5±1.87)%(图3)。对数据进行相关分析,细胞的存活率与PAFR拮抗剂之间存在显著正相关关系(r=

表1 无菌组细胞存活率(%)的比较

Tab.1 Cell viability of HUVECs (%) treated with different concentrations of CV3988 (n=3, *Mean*±*SD*)

	CV3988 (nmol/L)					$F^{\#}$	P
	0	50	100	200	500		
Cell viability	100	98.53±0.69	95.82±1.44	96.55±1.39	97.17±1.02	0.967	0.467
$P^{\#}$	-	0.260	0.152	0.200	0.164	-	-

The $P^{\#}$ value is equal to the P value of P=4 after the correction. $F^{\#}$ compared with each treatment group without treatment group.

0.938，P=0.000）由此可见，PAFR拮抗剂和抗PAFR抗体有效的阻止了PC阳性的Aa诱导的细胞死亡。

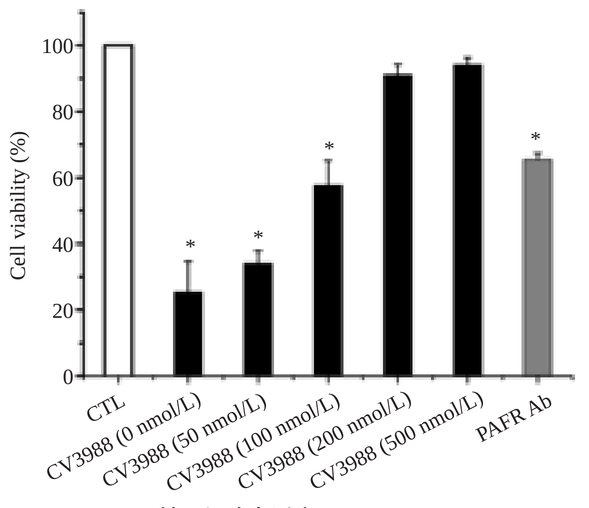


图3 PC阳性组细胞存活率

Fig.3 Cell viability of pretreated HUVECs after incubation with PC-positive Aa by MTT assay (*Mean*±*SD*). *P<0.05 *vs* CTL.

我们同时对PC阴性的Aa进行了研究及分析证实了这一结果（图4）。通过对预处理和未预处理组进行相比，各组之间无统计学差异（F=0.437，P=0.799），说明PC阴性的Aa感染HUVEC后，细胞存活率并没有显著增加。对数据进行相关分析显示，细胞存活率与PAFR拮抗剂之间无相关性（r=0.350，P=0.200）。

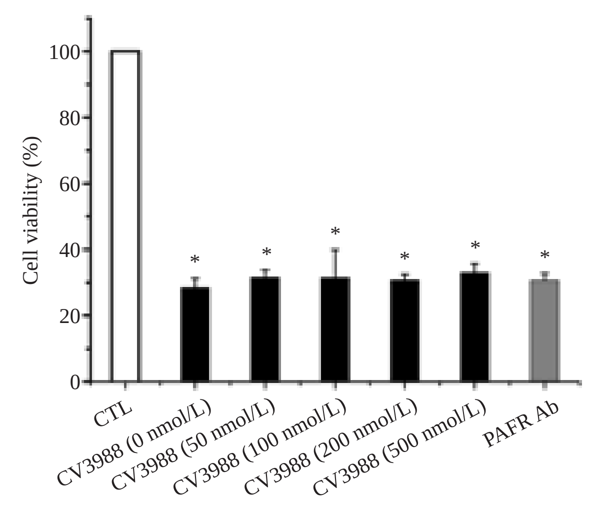


图4 PC阴性组细胞存活率

Fig.4 Cell viability of pretreated HUVECs following incubation with PC-negative Aa by MTT assay (*Mean*±*SD*). *P>0.05.

3 讨论

对宿主细胞的黏附和侵袭是各种病原菌发挥致病作用的关键环节。目前认为Aa侵入宿主细胞的过程是一个动态的、多步骤的、复杂的过程，Aa在进入宿主细胞的过程受到细胞表面受体的介导及调控[19-20]。

PAFR属于G蛋白偶联受体家族，通过与血小板活化因子(PAF)结合介导细胞的内吞作用。Barbier等[21]报道PC与PAFR结合后可介导铜绿假单胞菌定植在呼吸道上皮细胞。Schenkein等[9]曾经提出PC阳性的Aa菌株对HUVEC的黏附和侵袭可能也是通过PAFR介导的。为此，我们在本实验中对PAFR是否介导了PC阳性Aa的黏附侵袭过程进行了研究。我们在培养基中加入PAFR拮抗剂CV-3988，然后观察到当PAFR受到抑制后Aa对细胞的黏附和侵袭发生了明显下降，当CV-3988的浓度升高到一定程度时，几乎完全阻止了Aa对HUVEC的黏附和侵袭。为了进一步验证PAFR参与了Aa对HUVEC的黏附和侵袭，我们利用PAFR抗体对PAFR进行了抑制，同样发现PAFR受到抑制后，Aa的黏附、侵袭及细胞活力均受到了明显影响。这与Smani等[22]的研究相似，PAFR介导了鲍氏不动杆菌对人肺上皮细胞的黏附和侵袭的过程。

Smani等在实验中发现鲍氏不动杆菌表面的PC与人肺上皮细胞表面的PAFR结合，引起一系列下游信号通路的激活，完成细菌的内吞或跨膜过程[22-23]，最终导致了宿主细胞的死亡。我们在实验中检测了PAFR受到抑制后Aa对细胞活力的影响，同样发现未处理组细胞活力明显降低，可见PAFR受到抑制后，明显降低了Aa对细胞的毒力作用。因此我们推测，当Aa接触到HUVEC后，其表面的PC可能与细胞表面的PAFR结合，从而传递信号给细胞膜，诱发一系列下游信号系统的级联反应，使得Aa对宿主细胞进行侵袭和杀伤，最终导致了宿主细胞的死亡。

综上所述，本研究发现PAFR介导了Aa黏附和侵袭HUVEC的过程。由于PAFR存在于多种内皮细胞和上皮细胞表面，包括牙周黏膜上皮细胞等，因此，PAFR可能同样介导了Aa对牙周组织的入侵过程，这为我们研究Aa在牙周病中的致病机制提供了新的思路。

参考文献：

［1］ Swords WE, Buscher BA, Ver Steeg Ii K, et al. Non-typeable Haemophilus influenzae adhere to and invade human bronchial epithelial cells *via* an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor［J］. Mol Microbiol, 2000, 37(1): 13-27.

［2］ Krishnamurthy A, Kyd J. The roles of epithelial cell contact, respiratory bacterial interactions and phosphorylcholine in promoting biofilm formation by Streptococcus pneumoniae and nontypeable Haemophilus influenzae［J］. Microbes Infect, 2014, 16 (8): 640-7.

［3］ Puig C, Marti S, Hermans PW, et al. Incorporation of phosphorylcholine into the lipooligosaccharide of nontypeable Haemophilus influenzae does not correlate with the level of biofilm formation *in*

vitro[J]. Infect Immun, 2014, 82(4): 1591-9.

[4] Hong W, Pang B, West-Barnette S, et al. Phosphorylcholine expression by nontypeable Haemophilus influenzae correlates with maturation of biofilm communities *in vitro* and *in vivo* [J]. J Bacteriol, 2007, 189(22): 8300-7.

[5] Fujita K, Hirano T, Kodama S, et al. Prognostic impact of phosphorylcholine expression in nontypeable Haemophilus influenzae in otitis media with effusion[J]. Acta Otolaryngol, 2009, 129(8): 832-8.

[6] Schenkein HA, Gunsolley JC, Best AM, et al. Antiphosphorylcholine antibody levels are elevated in humans with periodontal diseases[J]. Infect Immun, 1999, 67(9): 4814-8.

[7] Schenkein HA, Berry CR, Purkall D, et al. Phosphorylcholine-dependent cross-reactivity between dental plaque bacteria and oxidized low-density lipoproteins[J]. Infect Immun, 2001, 69(11): 6612-7.

[8] Purkall D, Tew JG, Schenkein HA. Opsonization of actinobacillus actinomycetemcomitans by immunoglobulin G antibody reactive with phosphorylcholine[J]. Infect Immun, 2002, 70(11): 6485-8.

[9] Schenkein HA, Barbour SE, Berry CR, et al. Invasion of human vascular endothelial cells by Actinobacillus actinomycetemcomitans via the receptor for platelet-activating factor [J]. Infect Immun, 2000, 68(9): 5416-9.

[10] Krishnamurthy S, Behlke MA, Apicella MA, et al. Platelet activating factor receptor activation improves siRNA uptake and RNAi responses in well-differentiated airway epithelia [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2014, 3(8): e175.

[11] Gerber J, Redlich S, Ribes S, et al. Intrathecal treatment with the anti-phosphorylcholine monoclonal antibody TEPC-15 decreases neuronal damage in experimental pneumococcal meningitis [J]. Chemotherapy, 2012, 58(3): 212-6.

[12] Gilley RP, Orihuela CJ. Pneumococci in biofilms are non-invasive: implications on nasopharyngeal colonization[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2014, 4(7): 163.

[13] Bougnères L, Girardin SE, Weed SA, et al. Cortactin and Crk cooperate to trigger actin polymerization during Shigella invasion of epithelial cells[J]. J Cell Biol, 2004, 166(2): 225-35.

[14] Patel JC, Galán JE. Manipulation of the host actin cytoskeleton by Salmonella-all in the Name of entry[J]. Curr Opin Microbiol, 2005, 8(1): 10-5.

[15] Kwok T, Backert S, Schwarz H, et al. Specific entry of Helicobacter pylori into cultured gastric epithelial cells *via* a zipper-like mechanism[J]. Infect Immun, 2002, 70(4): 2108-20.

[16] Cossart P, Veiga E. Non-classical use of clathrin during bacterial infections[J]. J Microsc, 2008, 231(3): 524-8.

[17] Imamura K, Kokubu E, Kita D, et al. Cigarette smoke condensate modulates migration of human gingival epithelial cells and their interactions with *Porphyromonas gingivalis*[J]. J Periodontal Res, 2015, 50(3): 411-21.

[18] Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki-Cárdenas P, Garcés CP, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* adheres to human gingival fibroblasts and modifies cytoskeletal organization[J]. Cell Biol Int, 2007, 31(9): 1063-8.

[19] Meyer DH, Fives-Taylor PM. The role of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of periodontal disease [J]. Trends Microbiol, 1997, 5(6): 224-8.

[20] Meyer DH, Rose JE, Lippmann JE, et al. Microtubules are associatciated with intracellular movement and spread of the periodontopathogen Actinobacillus actinomycetemcomitans [J]. Infect Immun, 1999, 67(12): 6518-25.

[21] Barbier M, Oliver A, Rao J, et al. Novel phosphorylcholine-containing protein of *Pseudomonas aeruginosa* chronic infection isolates interacts with airway epithelial cells[J]. J Infect Dis, 2008, 197(3): 465-73.

[22] Smani Y, Docobo-Pérez F, López-Rojas R, et al. Platelet-activating factor receptor initiates contact of *Acinetobacter baumannii* expressing phosphorylcholine with host cells [J]. J Biol Chem, 2012, 287(32): 26901-10.

[23] Smani Y, Docobo-Pérez F, Mcconnell MJ, et al. Acinetobacter baumannii-induced lung cell death: role of inflammation, oxidative stress and cytosolic calcium [J]. Microb Pathog, 2011, 50(5): 224-32.

（编辑:孙昌朋）